

PCT/JP99/04602

4

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 18 OCT 1999 08.99	
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 8月27日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第241248号

出 願 人

Applicant (s):

協和醗酵工業株式会社

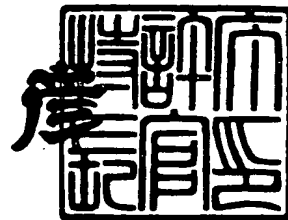
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3065804

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】	特許願
【整理番号】	H10-1054N2
【提出日】	平成10年 8月27日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12N 15/00
【発明の名称】	新規ポリペプチド
【請求項の数】	51
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県駿東郡長泉町本宿 2 3 4 - 1 6
【氏名】	宮地 宏昌
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県駿東郡長泉町本宿 1 5 1 - 1
【氏名】	三村 英樹
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 9 4 - 1 1 5
【氏名】	神部 素子
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都町田市中町 3 - 9 - 9
【氏名】	中川 智
【特許出願人】	
【識別番号】	000001029
【氏名又は名称】	協和醗酵工業株式会社
【代表者】	平田 正
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	008187
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ポリペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 2】 配列番号 1 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 4】 配列番号 2 記載の塩基配列を有する DNA。

【請求項 5】 請求項 3 または 4 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 6】 請求項 3 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA。

【請求項 7】 組換え体 DNA が、プラスミド p 46-1 である、請求項 6 記載の組換え体 DNA。

【請求項 8】 請求項 6 または 7 記載の組換え体 DNA を保有する形質転換体。

【請求項 9】 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から選ばれる形質転換体である、請求項 8 記載の形質転換体。

【請求項 10】 微生物が、Escherichia 属に属する微生物である、請求項 9 記載の形質転換体。

【請求項 11】 Escherichia 属に属する微生物が、Escherichia coli JM109/p46-1 (FERM BP-6462) である、請求項 10 記載の形質転換体。

【請求項 12】 請求項 8 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 13】 請求項 3 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA の有する塩基

特平 10-2412

【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

配列中の連続した 5～60 塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

【請求項 14】 誘導体オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C-5 プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA 中のリボースが 2' - O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが 2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、請求項 13 記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 15】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする mRNA を検出する方法。

【請求項 16】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

【請求項 17】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを認識する抗体。

【請求項 18】 請求項 17 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

【請求項 19】 請求項 17 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの免疫組織染色法。

【請求項 20】 請求項 17 記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

【請求項 21】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドと被験試料とを接触

させることを特徴とする、該ポリペプチドの有するヌクレオシドのトランスポート活性を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 22】 請求項 21 記載の方法により得られる化合物。

【請求項 23】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 24】 請求項 15 記載の方法を用い、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする mRNA を検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、請求項 23 記載のスクリーニング方法。

【請求項 25】 請求項 18 記載の方法を用い、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、請求項 23 記載のスクリーニング方法。

【請求項 26】 請求項 23～25 のいずれか 1 項に記載の方法により得られる化合物。

【請求項 27】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の予防薬。

【請求項 28】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の治療薬。

【請求項 29】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを含有する、抗ウイルス剤の作用増強剤。

【請求項 30】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを含有する、悪性腫瘍治療薬の作用増強剤。

【請求項 31】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを含有する、鎮痛薬。

【請求項 32】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを含有する、血小板凝集阻害薬。

【請求項 33】 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを含有する、化学療法時の副作用の低減剤。

【請求項 34】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の予防薬。

【請求項 35】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の治療薬。

【請求項 36】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、抗ウイルス剤の作用増強剤。

【請求項 37】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、悪性腫瘍治療薬の作用増強剤。

【請求項 38】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、鎮痛薬。

【請求項 39】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、血小板凝集阻害薬。

【請求項 40】 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを含有する、化学療法時の副作用の低減剤。

【請求項 41】 請求項 17 記載の抗体を含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の予防薬。

【請求項 42】 請求項 17 記載の抗体を含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の治療薬。

【請求項 43】 請求項 17 記載の抗体を含有する、抗ウイルス剤の作用増強剤。

【請求項 44】 請求項 17 記載の抗体を含有する、悪性腫瘍治療薬の作用増強剤。

【請求項 45】 請求項 17 記載の抗体を含有する、鎮痛薬。

【請求項46】 請求項17記載の抗体を含有する、血小板凝集阻害薬。

【請求項47】 請求項17記載の抗体を含有する、化学療法時の副作用の低減剤。

【請求項48】 請求項1または2記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

【請求項49】 請求項48記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項50】 レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子から選ばれる遺伝子である、請求項49記載のスクリーニング方法。

【請求項51】 請求項49または50記載の方法により得られる化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規トランスポーターポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該トランスポーターポリペプチドの製造方法に関する。また、本発明は該ポリペプチドと特異的に反応する抗体、該抗体を産生する微生物、動物細胞又は動物、および該ポリペプチドもしくはその一部又はそれらを発現した微生物もしくは動物細胞等を利用したリガンド活性を有する化合物を探索する方法および細胞を利用した該ポリペプチドの遺伝子発現を調節する化合物を探索する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

哺乳動物細胞は、アデノシン、シチジン、グアノシン、イノシン、チミジン、ウリジン等の生理的なヌクレオシド(nucleoside)の細胞への取り込みを Na^+ 依

存性および Na^+ 非依存性の機構で行っていることが知られている [Drug Transport in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, pp.403-451, Marcel Dekker, New York (1995)、Biochim. Biophys. Acta., 1286, 153 (1996)]。

【0003】

このような機構は新生経路(de novo pathway)を欠損した造血系細胞等において再利用経路 (salvage pathway) によるヌクレオチドおよび核酸合成に必須であるばかりでなく、白血病やAIDS等の抗腫瘍、抗ウイルス治療に用いられる多くの細胞障害性ヌクレオシド誘導体の細胞への取り込みにも関与している [Nucleosides Nucleotides, 11, 903 (1992)、J. Antimicrobiol. Chemother., 32, Suppl. A, 133(1993)]。

【0004】

さらにヌクレオシドトランスポート過程はアデノシンを介する種々の生理作用、具体的には、冠動脈血管拡張、腎血管収縮、神経伝達、血小板凝集、脂肪分解等においても重要な役割を果たしていることが報告されている [Prog. Cardiovasc. Dis., 32, 73 (1989)、Purines in Cellular Signaling: Targets for New Drugs, Springer-Verlag, New York (1990)、Adenosine and Adenine Nucleotides: From Molecular Biology to Integrative Physiology, Kluwer Academic Publishers, Boston (1995)]。

【0005】

Na^+ 依存性のヌクレオシドトランスポーター（濃縮型ヌクレオシドトランスポーター）は、機能的に特殊化した細胞、例えば、腸および腎臓の上皮、脈絡膜叢、肝臓、マクロファージ、脾臓細胞あるいは白血病細胞等に発現が限局しており、原形質膜の Na^+ 濃度勾配により駆動され、ヌクレオシドを細胞内に取り込む [Drug Transport in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, pp.403-451, Marcel Dekker, New York (1995)、Biochim. Biophys. Acta., 1286, 153 (1996)]。

【0006】

一方、 Na^+ 非依存性ヌクレオシドトランスポーターは多くの細胞、組織に普遍的に発現しており、原形質膜を介したヌクレオシドの流出および流入の両方に

関与しており拮散型ヌクレオシドトランスポーター (equilibrative nucleoside transporter; ENT) と呼ばれている。

【0007】

ENTは阻害剤nitrobenzylthioinosine(NBMPR; 6-[(4-nitrobenzyl)thio]-9-β-D-ribofuranosylpurine)に対する感受性により、NBMPRに高親和性 ($K_d = 0.1 \sim 10 \text{ nM}$) を示す equilibrative sensitive (e s) 型トランスポーターと、低濃度 (nMオーダー) のNBMPRでは阻害されず、高濃度 (μM オーダー) で阻害される equilibrative insensitive (e i) 型トランスポーターの2種類に分類されている [Drug Transport in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, pp.403-451, Marcel Decker, New York (1995)、Biochim. Biophys. Acta., 1286, 153 (1996)]。

【0008】

e s 型のトランスポーターは、ジピリダモール(dipyridamole)やジラゼップ(dilazep)等の冠動脈血管拡張薬の薬理学的標的であることが知られている [Prog. Cardiovasc. Dis., 32, 73 (1989)、Purines in Cellular Signaling: Targets for New Drugs, Springer-Verlag, New York (1990)]。

【0009】

ENTとしてこれまでに、ヒトおよびラット e s 型トランスポーター cDNA (それぞれ hENT1、rENT1)、ヒトおよびラット e i 型トランスポーター cDNA (それぞれ hENT2、rENT2) のクローン化が報告されている [Nature Medicine, 3, 89 (1997)、J. Biol. Chem., 272, 28423 (1997)、J. Biol. Chem., 273, 5288 (1998)、Biochemical J., 328, 739 (1997)]。

【0010】

これらの拮散型トランスポーターは、11回膜貫通型の膜糖蛋白質であると推定されており、相互に相同性が認められる (hENT1とhENT2でアミノ酸レベルで約60%の一致、rENT1とrENT2でアミノ酸レベルで約50%の一致)。

hENT1は濃縮型トランスポーター cNT1 [J. Biol. Chem., 269, 17757 (1994)] や細菌のヌクレオシドトランスポーター nupC [Mol. Microbiol., 11, 1159 (1994)]、nupG [Eur. J. Biochem., 168, 385 (1987)] との有意な相同性は見出され

ていない。

【0011】

一方、線虫 (Caenorhabditis elegans) のゲノムプロジェクトより見出された ZK809.4, F16H11.3 にそれぞれアミノ酸レベルで 23%、21% の一致が認められた。また、酵母 (Saccharomyces cerevisiae) の FUN26 と 20% の一致が認められた。これらの蛋白質の機能は不明であるが対応する生物におけるヌクレオシドトランスポーターの可能性が指摘されている [Nature Medicine, 3, 89 (1997)]。

【0012】

ENT には細胞、組織により不均一性 (heterogeneity) が認められることから、さらなる ENT アイソフォームが存在している可能性が示唆されている [Biochim. Biophys. Acta., 1286, 153 (1996)]。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ヌクレオシド等の分子を細胞内に輸送または細胞外に排出する新規トランスポーターポリペプチド、該トランスポーターポリペプチドをコードする DNA、該ポリペプチドを認識する抗体を利用し、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧等の予防薬、治療薬を提供することを目的とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、hENT1 の遺伝子配列情報を基に、ランダムなヒト cDNA 配列の遺伝子配列データベース Genbank に登録されている EST (Expressed Sequence Tag) に関して、フレームサーチ [イスラエル、コンピュジェン (Compugen) 社製] 相同性検索ソフトウェアを用い解析し、hENT1 と相同性の認められる部分配列 (R07250 および AA608799) を見出した。これらの EST 配列を用いて新規なトランスポーターポリペプチドの cDNA を取得して塩基配列を解析し、本発明を完成するに至った。

【0015】

即ち、本発明は以下の(1)～(51)の発明に関する。

(1)は配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

(2)は配列番号1記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチドである。

【0016】

上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

【0017】

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー クローニング 第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント プロトコル イン モレキュラー バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817(1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0018】

(3)は上記(1)または(2)記載のポリペプチドをコードするDNAである。

(4)は配列番号2記載の塩基配列を有するDNAである。

(5)は上記(3)または(4)記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチド

をコードするDNAである。

【0019】

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチドをコードするDNA」とは、上記(3)または(4)記載のDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

【0020】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー クローニング 第2版、カレントプロトコル イン モレキュラ バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0021】

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号2で表される塩基配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

(6)は上記(3)~(5)のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAである。

【0022】

(7)は組換え体DNAが、プラスミドp46-1である、上記(6)記載の組換え体DNAである。

(8)は上記(6)または(7)記載の組換え体DNAを保有する形質転換体である。

【0023】

(9) は形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から選ばれた形質転換体である、上記(8)記載の形質転換体である。

(10) は微生物が、Escherichia属に属する微生物である、上記(9)記載の形質転換体である。

【0024】

(11) はEscherichia属に属する微生物が、Escherichia coli JM109/p46-1 (FERM BP-6462) である、上記(10)記載の形質転換体である。

(12) は上記(8)～(11)のいずれか1つに記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(1)または(2)記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、上記(1)または(2)記載のポリペプチドの製造方法である。

【0025】

(13) は上記(3)～(5)のいずれか1つに記載のDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチドである。

【0026】

(14) は誘導体オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxaz

ine-modified cytosine)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、上記(13)記載のオリゴヌクレオチドである。

【0027】

(15)は上記(13)または(14)記載のオリゴヌクレオチドを用い、上記(1)または(2)記載のポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法である。

(16)は上記(13)または(14)記載のオリゴヌクレオチドを用い、上記(1)または(2)記載のポリペプチドの発現を抑制する方法である。

【0028】

(17)は上記(1)または(2)記載のポリペプチドを認識する抗体である。

(18)は上記(17)記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)または(2)記載のポリペプチドの免疫学的検出法である。

(19)は上記(17)記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)または(2)記載のポリペプチドの免疫組織染色法である。

【0029】

(20)は上記(17)記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤である。

(21)は上記(1)または(2)記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有するヌクレオシドのトランスポート活性を変動させる化合物のスクリーニング方法である。

【0030】

(22)は上記(21)記載の方法により得られる化合物である。

(23)は上記(1)または(2)記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法である。

【0031】

(24)は上記(15)記載の方法を用い、上記(1)または(2)記載のポリ

ペプチドをコードする mRNA を検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、上記 (23) 記載のスクリーニング方法である。

【0032】

(25) は上記 (18) 記載の方法を用い、上記 (1) または (2) 記載のポリペプチドを検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、上記 (23) 記載のスクリーニング方法である。

(26) は上記 (23) ~ (25) のいずれか 1 つに記載の方法により得られる化合物である。

【0033】

(27) は上記 (1) または (2) 記載のポリペプチドを含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、肺炎または高血圧の予防薬である。

(28) は上記 (1) または (2) 記載のポリペプチドを含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、肺炎または高血圧の治療薬である。

【0034】

(29) は上記 (1) または (2) 記載のポリペプチドを含有する、抗ウイルス剤の作用増強剤である。

(30) は上記 (1) または (2) 記載のポリペプチドを含有する、悪性腫瘍治療薬の作用増強剤である。

【0035】

(31) は上記 (1) または (2) 記載のポリペプチドを含有する、鎮痛薬である。

(32) は上記 (1) または (2) 記載のポリペプチドを含有する、血小板凝集阻害薬である。

【0036】

(33) は上記 (1) または (2) 記載のポリペプチドを含有する、化学療法時

の副作用の低減剤である。

(34)は上記(13)または(14)記載のオリゴヌクレオチドを含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の予防薬である。

【0037】

(35)は上記(13)または(14)記載のオリゴヌクレオチドを含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の治療薬である。

(36)は上記(13)または(14)記載のオリゴヌクレオチドを含有する、抗ウイルス剤の作用増強剤である。

【0038】

(37)は上記(13)または(14)記載のオリゴヌクレオチドを含有する、悪性腫瘍治療薬の作用増強剤である。

(38)は上記(13)または(14)記載のオリゴヌクレオチドを含有する、鎮痛薬である。

【0039】

(39)は上記(13)または(14)記載のオリゴヌクレオチドを含有する、血小板凝集阻害薬である。

(40)は上記(13)または(14)記載のオリゴヌクレオチドを含有する、化学療法時の副作用の低減剤である。

【0040】

(41)は上記(17)記載の抗体を含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の予防薬である。

(42)は上記(17)記載の抗体を含有する、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の治療薬である。

【0041】

(43)は上記(17)記載の抗体を含有する、抗ウイルス剤の作用増強剤であ

る。

(44) は上記 (17) 記載の抗体を含有する、悪性腫瘍治療薬の作用増強剤である。

(45) は上記 (17) 記載の抗体を含有する、鎮痛薬である。

【0042】

(46) は上記 (17) 記載の抗体を含有する、血小板凝集阻害薬である。

(47) は上記 (17) 記載の抗体を含有する、化学療法時の副作用の低減剤である。

(48) は上記 (1) または (2) 記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNAである。

【0043】

(49) は上記 (48) 記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法である。

【0044】

(50) はレポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子から選ばれる遺伝子である、上記 (49) 記載のスクリーニング方法である。

(51) は上記 (49) または (50) 記載の方法により得られる化合物である。

【0045】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

[1] 本発明のDNAの取得およびオリゴヌクレオチドの調製

hENT1 [Nature Medicine, 3, 89 (1997)] と相同性をもつ遺伝子を、遺伝子データベース、蛋白質データベースより、Blast、Smith-Waterman法等を利用した

プログラムあるいはフレームサーチ〔イスラエル、コンピュジェン (Compugen) 社製〕 相同性検索ソフトウェアを利用して検索する。

データベースとしてはGenBank、Swiss-Plot等の公的なデータベースを利用することができる。

【0046】

得られた、hENT1と相同性をもつ遺伝子が、EST (Expressed Sequence Tag) のように、遺伝子の一部の塩基配列のみである場合は、以下のようにしてその cDNA の全長を得ることができ、該 cDNA より本発明の DNA を取得することができる。

【0047】

(1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNAあるいはmRNAを調製する。

全RNAを調製する方法として、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学 9, 1937 (1991)] 等を用いることができる。

【0048】

全RNAからポリ (A)⁺RNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー クローニング 第2版) やオリゴdTラテックスを用いる方法 [細胞光学 別冊8「新細胞工学実験プロトコール」秀潤社48-52頁(1993)、Nucleic Acids Res., Symposium Series, 19, 61 (1988)] 等を用いることができる。

ファースト・トラック・mRNA単離キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA精製キット [Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] 等のキットを用いて組織や細胞から直接mRNAを調製することもできる。

【0049】

適切な細胞または組織として、データベースから見出されたEST等が含まれ

ていた cDNA ライブラリーの種類を調べ、該ライブラリーを構築するために用いた細胞または組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

得られた全 RNA あるいは mRNA を用い、常法により cDNA ライブラリーを作製する。

【0050】

cDNA ライブラリー作製法として、モレキュラー クローニング 第2版やカレント プロトコールズ イン モレキュラー バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコ BRL (Gibco BRL) 社製] やザップー cDNA シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等をあげることができる。

【0051】

cDNA ライブラリーを作成するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda

ZAP II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名 pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)] 等をあげることができる。

【0052】

宿主微生物としては、大腸菌 Escherichia coli に属する微生物であればいずれ

も用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli N M522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLRTM Strain (ストラタジーン社製)、Escherichia coli LE392 (モレキュラー クローニング 第2版) 等を用いることができる。

【0053】

上記方法により作製した cDNA ライブラリーに加え、市販の cDNA ライブラリーも利用することができる。

市販の cDNA ライブラリーとして、クローンテック社、ライフテックオリエンタル社等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器 cDNA ライブラリーをあげることができる。

【0054】

(2) 本発明の DNA の取得

上記(1)で作製した cDNA ライブラリーより、本発明の DNA を有する cDNA クローンを、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー クローニング 第2版] 等により選択することができる。

【0055】

プローブとしては、一部明らかになっている塩基配列に基いたプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応法 (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCR と略す) を利用した方法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] で cDNA の一部を増幅した断片や、一部明らかになっている塩基配列に基いたオリゴヌクレオチドを利用することができる。

【0056】

プライマーとして、全長 cDNA の 5' 端側および 3' 端側の両方の塩基配列が EST 等により明らかになっている場合には、その塩基配列に基いて調製した

プライマーを用いることができる。

【0057】

該 cDNA の両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーで PCR を行う 5' - RACE (rapid amplification of cDNA ends) および 3' - RACE [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)] により、プライマーに用いた配列よりも 5' 端側および 3' 端側の cDNA 断片を得ることができる。

【0058】

得られた cDNA 断片をつなぎあわせることにより、本発明の全長 DNA を取得することができる。

上記の方法により取得された DNA の塩基配列は、該 DNA 断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいはパーキン・エルマー社 (Perkin Elmer: 373A・DNA シークエンサー)、ファルマシア社、ライコア (LI-COR) 社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

【0059】

上記方法により取得された本発明の DNA を含むプラスミドとして、例えば、配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA を有するプラスミド p46-1 をあげることができる。

プラスミド p46-1 を含有する大腸菌 Escherichia coli JM109/p46-1 は、FERM BP-6462 として、平成 10 年 8 月 18 日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 3 番 (郵便番号 305-0046) に寄託されている。

【0060】

また、上記方法で取得した DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒト由来の目的とする DNA を取得することができる。

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA 合成機で化学合成する

ことにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

【0061】

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJ等の塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。

新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換したのちFASTA、フレームサーチ (FrameSearch) 等の相同性検索プログラムを用いて、GenPept、PIR、Swiss-Prot等のアミノ酸配列データベースを検索することにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

【0062】

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドの調製

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、常法あるいは上記記載のDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【0063】

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号2で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度 (T_m) および塩基数が極端に変わることはない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。

【0064】

該オリゴヌクレオチドとして、例えば、配列番号3または4で表されるオリゴヌクレオチドをあげることができる。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

【0065】

該誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースが2' -O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2' -メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

【0066】

〔2〕本発明のポリペプチドの調製

(1) 形質転換体の作製

上記〔1〕に記載の方法により取得した本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー クローニング 第2版、カレント プロトコル イン モレキュラ バイオロジー等に記載された方法を用いることができる。

【0067】

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換えベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することによ

り、本発明のポリペプチドを製造することができる。

【0068】

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0069】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、本発明のポリペプチド遺伝子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0070】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（ファルマシア社）、pSE280（インビトロジェン社）、pGEMEX-1〔プロメガ(Promega)社〕、pQE-8（キアゲン(QIAGEN)社）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社）、pTrs32（FERM BP-5408）、pGHA2（FERM BP-400）、pGKA2（FERM B-6798）、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pGEX（ファルマシア社）、pET-3（ノバジェン社）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen社）、pMAL-c2（New England Biolabs社）等をあげることができる。

【0071】

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモ-

ター (P_{lac})、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP_{trp}を2つ直列させたプロモーター (P_{trp} x 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0072】

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0073】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY 3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli H B101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli N Y49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

【0074】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Pr

oc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942)、エレクトロポレーション法 [Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)] 等をあげることができる。

【0075】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【0076】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983)] 等をあげることができる。

【0077】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c DNA I/Amp (インビトロジェン社製)、p c DNA I、p CDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、p AGE 107 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、p REP4 (インビトロジェン社製)、p AGE 103 [Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、p AMo、p AMoA、p AS3-3

(特開平2-227075) 等が用いられる。

【0078】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0079】

動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

【0080】

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)、293等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

【0081】

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

【0082】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, NewYork (1992

))、モレキュラー・バイオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

【0083】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

【0084】

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

【0085】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル) 等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製) 等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

【0086】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0087】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー クローニング 第

2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

【0088】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

また、患者の生体内から採取した細胞に、適切な本発明のポリペプチドを発現させるための発現ベクターを導入した後、細胞を生体内に戻すことにより、本発明のポリペプチドを患者の生体内で発現させることもできる。

【0089】

(2) 形質転換体の培養

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0090】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

【0091】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌

体、およびその消化物等を用いることができる。

【0092】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0093】

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0094】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0095】

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン

等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0096】

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーマンジェン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRH バイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製〕、Grace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0097】

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

(3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

【0098】

例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

【0099】

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0100】

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

【0101】

該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0102】

本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0103】

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドをFlagペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗Flag抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティーク

ロマトグラフィーで精製することもできる。

【0104】

更に、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（tert-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。

また、アドバンスド・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

【0105】

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。

【0106】

[3] 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

(1) ポリクローナル抗体の調製

上記[2]に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

【0107】

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3～20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン（keyhole limpet haemocyanin）や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

【0108】

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法（ELISA法）：医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)〕等で確認する。

【0109】

免疫に用いた抗原に対し、該血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

【0110】

(2) モノクローナル抗体の調製

(2-1) 抗体産生細胞の調製

上記(1)において、免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

【0111】

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0112】

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

【0113】

(2-2) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン (1.5mM)、2-メルカプトエタノール (5×10^{-5} M)、ジェンタマイシン ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ($15 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

【0114】

(2-3) ハイブリドーマの作製

(2-1)で取得した抗体産生細胞と(2-2)で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞 = 5~10 : 1 になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0115】

得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7ml を混合した溶液を0.2~1ml 添加し、更に1~2分間毎にMEM培地 1~2ml を数回添加する。

【0116】

添加後、MEM培地を加えて全量が50ml になるように調製する。

該調製液を 900 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに HAT 培地〔正常培地にヒポキサンチン ($10^{-4}M$)、チミジン ($1.5 \times 10^{-5}M$) およびアミノプテリン ($4 \times 10^{-7}M$) を加えた培地〕 100 ml 中に懸濁する。

【0117】

該懸濁液を 96 穴培養用プレートに $100 \mu l$ / 穴ずつ分注し、5% CO_2 インキュベーター中、37℃で 7～14 日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 14 (1988)] 等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0118】

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(2-4)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0119】

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを 2 回繰り返す〔1 回目は、HT 培地 (HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地)、2 回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

【0120】

(2-4)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5 ml を腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(2-3)で取得した本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

【0121】

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000 rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

【0122】

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280 nmでの吸光度より算出する。

【0123】

〔4〕本発明のポリペプチドのヌクレオシドトランスポーター活性の測定

〔2〕に記載の方法により、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等を宿主として、本発明のポリペプチドを発現させたもの、あるいは、アフリカツメガエル卵母細胞にDNAあるいは *in vitro* で調製したcRNAを用いてマイクロインジェクション法により発現させたものを以下のヌクレオシドトランスポーター活性の測定に利用する [Methods in Enzymology, 207, 225 (1992)、Methods in Enzymology, 254, 458 (1995)]。

【0124】

また、公知の方法によりリポソーム膜〔脂質二重層 (lipid bilayer)〕上に上記で発現させた本発明のポリペプチドを再構成したものも以下の測定に用いることができる [J. Biol. Chem., 272, 617 (1997)、Biochim. Biophys. Acta., 1024, 289 (1990)、J. Biol. Chem., 252, 7384 (1977)]。

【0125】

ヌクレオシドトランスポーター活性は、本発明のポリペプチド存在下で、蛍光

標識あるいはアイソトープ標識したヌクレオシド、例えば [5,6-³H] uridine、[¹⁴C] uridine、[¹⁴C] adenosine等の、細胞あるいはリボソーム内への取り込みを測定することにより求めることができる [Biochim. Biophys. Acta., 649, 769 (1981)、Nature Medicine, 3, 89 (1997)、Biochem. J., 315, 329 (1996)、Biochim. Biophys. Acta., 1024, 289 (1990)]。

【0126】

[5] 本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの探索・同定および治療薬としての利用

上記[4]の活性測定に用いることのできる細胞、リボソームあるいは、後述[7]の方法で本発明のポリペプチドを発現していることの確認された組織、細胞等を用い、被験試料を添加し、[4]記載の方法で、トランスポーター活性を測定する。

【0127】

被験試料の添加の有無における、本発明のポリペプチドのトランスポーター活性 [Biochim. Biophys. Acta., 649, 769 (1981)、Nature Medicine, 3, 89 (1997)、Biochem. J., 315, 329 (1996)、Biochim. Biophys. Acta., 1024, 289 (1990)] を比較することにより、被験試料の中からトランスポーター活性を増強する物質（アゴニスト）および阻害する物質（アンタゴニスト）をスクリーニングすることができる。

【0128】

また、以下の方法を用いても、本発明のポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストをスクリーニングすることができる。

上記の本発明のポリペプチドを発現している細胞、組織、これらから調製した細胞膜、精製した本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドの部分断片を用い、これらへの標識化合物の結合の有無を確認する [Biochem. J., 327, 31 (1997)、Life Sciences, 59, 2051 (1996)、Biochem. J., 300, 407 (1994)]。

【0129】

標識化合物としては、例えば、[³H] NBMPR等のアイソトープ標識ヌクレオシドアナログ、アイソトープ標識した非ヌクレオシド骨格を有するヌクレオ

シドトランスポーター阻害剤 [Current Medicinal Chemistry, 4, 35 (1997)]
をあげることができる。

【0130】

結合が認められた標識化合物を用い、上記と同様の条件下で被験試料を添加し、上記と同様に標識化合物の結合量を測定する。

被験試料の添加の有無における、標識化合物の結合量を比較することにより、被験試料の中からアゴニストおよびアンタゴニストをスクリーニングすることができる。

【0131】

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物(例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等)の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。

【0132】

上記の方法により取得される、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、治療薬として単独で用いることが可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として用いることが望ましい。

【0133】

該治療薬の投与方法としては、治療に際し最も効果的な方法を使用することが望ましく、経口投与または、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与による方法を用いることができる。

該治療薬の剤形としては、軟膏剤、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、テープ剤等をあげることができる。

【0134】

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤

、顆粒剤等をあげることができる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造することができる。

【0135】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用い製造することができる。

【0136】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、例えば、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製することができる。

座剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製することができる。

【0137】

噴霧剤は、上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニストをそのまま噴霧剤として用いることが可能であるが、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製した噴霧剤が好ましい。

【0138】

担体として、具体的には乳糖、グリセリン等を例示することができる。

上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニスト、および担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤を調製することが可能である。

これらの非経口剤においても、経口剤で添加剤として例示した成分を添加することができる。

【0139】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

【0140】

[6]本発明のポリペプチドの発現を調節する化合物（以下、発現調節化合物と略す）の探索および同定

(1)本発明の抗体を用いた発現調節化合物の探索および同定

本発明のポリペプチドを発現する細胞を被験試料と接触させた後、本発明の抗体を用いることにより、その細胞中、細胞培養上清中に存在する発現調節化合物を探索、同定することができる。

【0141】

細胞としては、本発明のポリペプチドを発現している細胞、細胞株、組織ならいかなるものでも用いることができる。

また、下記[7]に記載した抗体により免疫学的に検出する方法を用い、該ポリペプチドの発現が認められた細胞、細胞株あるいは組織を用いることができる。

【0142】

好適な細胞株として、例えば、ヒト腎臓由来HEK293細胞(ATCC: CRL-1573)をあげることができる。

被験試料としては、上記[5]の被験試料であげたものを用いることができる。

本発明のポリペプチドを発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞と接触させた後、本発明の抗体を用い、該細胞の発現したポリペプチド含量を定量する。定量する方法としては、例えば下記の免疫細胞染色を利用した方法をあげることができる。

【0143】

培養付着細胞をPBS緩衝液で洗浄し、0.05%トリプシン、0.02% EDTA(エチレンジアミン4酢酸)を含むPBS緩衝液3mlを加え、余分な溶

液を除いた後、37℃、5分間インキュベートすることによりフラスコより細胞を剥がす。

【0144】

浮遊細胞については培養細胞をそのまま用いることができる。

免疫細胞染色を行う細胞を免疫細胞染色用緩衝液（1% BSA、0.02% EDTA、0.05% アジ化ナトリウムを含むPBS）等に懸濁し、 $1 \sim 20 \times 10^5$ 個ずつ丸底96穴プレートに分注する。

【0145】

該プレートに、本発明のモノクローナル抗体を分注する。

モノクローナル抗体としては、[3] (2-3)で取得した本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清、[3] (2-4)で取得した精製モノクローナル抗体をあげることができる。更に、該モノクローナル抗体を標識した抗体も用いることができる。

【0146】

モノクローナル抗体を標識した抗体としては、例えばビオチン標識した抗体をあげることができる。

ビオチン標識した抗体は公知の方法（酵素抗体法：学際企画刊1985年）で調製することができる。

【0147】

上記抗体を、免疫細胞染色用緩衝液あるいは10%動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて0.1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように希釈する。

該希釈抗体を20~500 $\mu\text{l}/\text{穴}$ となるように分注し、氷冷下で30分間放置する。

【0148】

標識されていない抗体を用いた場合には、上記プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を洗浄後、FITC (fluorescein isothiocyanate) あるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは抗ラットイムノグロブリン抗体を0.1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液を50~500 $\mu\text{l}/\text{穴}$ ほど分注し、氷冷下で30分間遮光

して放置する。

【0149】

ビオチン標識した該モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートにFITCあるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識したストレプトアビジンを50～500 μ l/穴ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。

両ケースとも、放置後、プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を良く洗浄し、蛍光顕微鏡、セルソーター等により解析する。

【0150】

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチド含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

【0151】

(2) 本発明のポリペプチド遺伝子の転写産物定量系を用いた探索および同定
本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現する細胞を被験試料と接触させた後、該mRNA含量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

【0152】

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドmRNAを発現する細胞および被験試料として、上記【6】(1)のものをを用いることができる。

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞が発現した該mRNAの含量を、通常のノーザンハイブリダイゼーション法、RNAのドットプロットハイブリダイゼーション法、RT-PCR法等を用い定量する。

【0153】

ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよびRT-PCR法等に用いることのできるプライマーとして、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子断片をあげることができる。

具体的には、配列番号2記載の塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列

を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを好適に用いることができる。

【0154】

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチドをコードする mRNA 含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

【0155】

(3) レポーター遺伝子を用いた探索および同定

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域（以下、転写制御領域と略す）の下流にレポーター遺伝子の連結された DNA を含むプラスミドで形質転換された形質転換体と被験試料とを接触させた後、レポーター遺伝子によりコードされたポリペプチドの発現量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

【0156】

転写制御領域は、通常、遺伝子の 5' 上流に含まれることが多い。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の 5' 上流領域は、例えば Genome Walker kits (Clontech 社製) 等を用いて調製することができる。また、該領域を適当な制限酵素を用い、適切な長さに切断した断片を転写制御領域として用いることができる。

【0157】

レポーター遺伝子としては、該遺伝子の翻訳産物が細胞内で安定であり、該翻訳産物の存在量が容易に定量できるものであればいかなるものでも用いることができ、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 β -ガラクトシダーゼ (β -gal)、ルシフェラーゼ (luc)、グリーンフルオレッセントプロテイン (GFP) 等をあげることができる。

【0158】

該転写制御領域を含むレポータープラスミドを導入する宿主細胞としては、いかなる細胞も用いることができるが、好適には、[6] (1) 記載の本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチド mRNA の発現が認められている細胞株を用

いることができる。

【0159】

被験試料として、上記[6](1)のものをを用いることができる。

転写制御領域の下流に常法によりレポーター遺伝子を連結し、作製したプラスミドを用い、常法により宿主細胞を形質転換する。

また、ポジティブセレクション用マーカー(G418耐性遺伝子等)およびネガティブセレクション用マーカー(単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼやジフテリア毒素Aフラグメント遺伝子等)をつないだジーンターゲティングベクターを作成し、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の一部をレポーター遺伝子で置換した細胞株を作成することもできる[Nature, 336, 348 (1988)、Analytical Biochemistry, 214, 77 (1993)、Gene Targeting, The Practical Approach Series, IRL Press (1993)]。

【0160】

該形質転換体を、例えば該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現したレポーター遺伝子にコードされたポリペプチドの量を、該ポリペプチドに適した方法で検出、定量する。

【0161】

検出、定量法として、CATの場合には、例えば、モレキュラー クローニング 第2版, 16章, 60頁に記載の方法を、 β -galの場合には、例えば、モレキュラー クローニング 第2版, 16章, 66頁に記載の方法を、lucの場合には、例えば、実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法, 81 (1994)に記載の方法を、GFPの場合には、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4653 (1997)記載の方法等をあげることができる。

【0162】

被験試料を添加しない系と比較し、レポーター遺伝子にコードされたポリペプチド含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

【0163】

〔7〕本発明のDNA、ポリペプチド、抗体、アゴニスト、アンタゴニストおよび発現調節化合物の利用

(1) 本発明のDNAは、該DNAをプローブとして用いて、ヒトの組織やヒト由来の細胞から〔1〕(1)と同様にして抽出したRNAについてノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、その組織や細胞における本発明のポリペプチド遺伝子のmRNAを検出あるいは定量することができる。各種の組織でそのmRNAの発現量を比較することにより本発明のポリペプチドの組織発現分布を知ることができる。

【0164】

(2) 本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のDNAの特異的プライマーとして用いて、ヒトの組織やヒト由来の細胞から〔1〕(1)と同様にして抽出したRNAについてRT-PCR [reverse transcription PCR; PCR Protocols (1990)]を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの検出や定量を行うことができる。

【0165】

該mRNAを定量する方法は、本遺伝子が関与する病態の診断や細胞障害性ヌクレオシド誘導体（抗腫瘍剤、抗ウイルス剤）の効果の予測等に用いることができる。

各種病態モデル動物において、該mRNAを定量することにより、病態における該遺伝子産物の重要性を明らかにすることができる。また、薬剤の有無による該mRNAの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

【0166】

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドは、これをプローブとして用いて、ヒトの組織切片に対してin situハイブリダイゼーション [Methods in Enzymology, 254, 419 (1995)]を行うことにより、組織内での本発明のポリペプチドの発現細胞の特定等のより細かい発現分布を知ることができる。

【0167】

これらの方法によって得られる、本発明のポリペプチドがどのような組織や細胞で発現しているかに関する情報および細胞がどのような刺激を受けたときに発

現量が変化するかに関する情報は、本発明のポリペプチドの生理機能や病態への関与を解析するために有用である。

【0168】

(4) 本発明のDNAをプローブとして用い、ゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーション〔モレキュラー クローニング 第2版〕を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出することができる。

変異の検出を行うことにより、該遺伝子の変異が原因となっている可能性のある、高血圧、虚血性心疾患、腎炎や膵炎等の疾患の診断を行うことができる。

【0169】

(5) 本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド(RNA/DNA)を用い、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写もしくはmRNAの翻訳を抑制することにより〔化学, 46, 681 (1991)、Bio/Technology, 9, 358 (1992)〕、該遺伝子が発症に関与している可能性のある、例えば高血圧、虚血性心疾患、腎炎や膵炎等の疾患の予防や治療に用いることができる。

【0170】

また、臓器移植に伴う免疫反応、鎮痛、血小板凝集阻害、化学療法時の副作用の低減、抗ウイルス剤および悪性腫瘍治療薬の作用増強剤、脳卒中時の脳障害の治療あるいは予防等への応用も期待される。

上述のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳開始領域にある5～60塩基と相補的な塩基配列を基にして設計・調製し、生体内に投与する。

【0171】

本発明のDNAを含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様の方法で投与することができる。

【0172】

(6) 本発明のDNAを用い、[2]記載の方法により本発明のポリペプチドを取得することができる。

本発明のポリペプチドの用途としては、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、肺炎または高血圧の治療薬または予防薬が考えられる。また、鎮痛薬、血小板凝集阻害薬、抗ウイルス剤および悪性腫瘍治療薬の作用増強剤あるいは、化学療法時の副作用の低減剤としての応用が期待される。

【0173】

本発明のポリペプチドを含有する医薬は、上記[5]の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記[5]の場合と同様の方法で投与することができる。

【0174】

(7) 本発明のオリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖としてレトロウィルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス等のウィルスベクター、その他のベクターに組み込んで遺伝子治療用ベクターとし、遺伝子治療に用いることができる。

(8) 本発明のポリペプチドを抗原として用い、[3]記載の方法により本発明のポリペプチドに対する抗体を製造することができる。

【0175】

本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて、本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量することができる。

具体的にはマイクロタイタープレートを用いるELISA法、酵素標識抗体法や蛍光抗体法による免疫組織染色、ウェスタンブロット法等を用いた検出法をあげることができる。

【0176】

具体的には、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体を用いるラジオイムノアッセイ法等があげることができる。

【0177】

また、本発明の抗体は病理組織切片を用いた免疫組織染色にも利用できる。

本発明の抗体を用い、健常者および被験者の細胞または組織に存在する本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量し、その量を健常者と被験者とで比較し、発現量が変化しているかどうかを調べることにより、被験者の虚血性心疾患、高血圧等の病態の診断や細胞障害性ヌクレオシド誘導体（抗腫瘍剤、抗ウイルス剤）の効果の予測等に用いることができる。

【0178】

（9）本発明のポリペプチドの機能（トランスポーター活性）を阻害する抗体を投与することにより、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の治療または予防、抗ウイルス剤および悪性腫瘍治療薬の作用増強、鎮痛作用、血小板凝集阻害さらには化学療法時の副作用の低減等が期待される。

【0179】

本発明の抗体を含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様の方法で投与することができる。

【0180】

（10）本発明のアゴニスト、アンタゴニストおよび本発明のポリペプチド遺伝子の発現を調節する化合物は、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、脾炎または高血圧の治療または予防、抗ウイルス剤および悪性腫瘍治療薬の作用増強、鎮痛作用、血小板凝集阻害さらには化学療法時の副作用の低減等が期待される。

【0181】

【実施例】

以下により具体的な実施例をあげて説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

【0182】

実施例1 hENT1関連蛋白(hENTR1) cDNAのクローン化

(1) ヒト胎児腎由来cDNAライブラリーからのクローン化

遺伝子操作的手法は特に断らない限り公知のモレキュラー クローニング 第2版に記載されている方法により行った。

【0183】

hENT1 [Nature Medicine, 3, 89 (1997)] と相同性をもつEST配列 (Genbank, ACCESSION R07250) より配列番号3に示される5'端側DNAプライマーを設計し、合成した。同様にEST配列 (Genbank, ACCESSION AA608799) より配列番号4に示される3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。

【0184】

配列番号3または配列番号4のプライマー200pmolを50mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、10mM 塩化マグネシウム、5mM ジチオスレイトール、5mM アデノシン3リン酸を含む緩衝液20 μ lに溶解し、10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) を加えて、37℃で2時間リン酸化反応を行い、2種類のリン酸化プライマーを取得した。

【0185】

得られた2種類のリン酸化プライマー各々0.2 μ M、ヒト胎児腎由来cDNAライブラリー (Clontech社製、商品名: Human Fetal Kidney 5'-STRETCH PLUS cDNA Library) 2 μ l、各成分200 μ MのdNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 混合液、TaKaRa Ex Taq (宝酒造社製) 2.5単位および1 \times Ex Taq緩衝液 (Mg plus) を含む反応溶液50 μ lを用い、下記条件下でPCRを行った。

【0186】

即ち、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用い、95℃で2分間加熱後、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間の工程を1サイクルとして35サイクル行い、更に72℃で8分間加熱した。

得られた該PCR反応液より5 μ lを分取し、アガロース電気泳動にかけ、予想される約1kbのDNA断片が増幅されたことを確認した。

【0187】

確認後、上記PCR反応液より、増幅されたDNA断片を、Wizard DNA Clean-Up System(Promega社製)を用い、滅菌水で溶出することにより、精製該DNA断片を取得した。

該DNA断片を、33 mM トリス-酢酸 (pH 7.9)、66 mM 酢酸カリウム、10 mM 酢酸マグネシウム、0.5 mM ジチオスレイトール、各成分100 μ MのdNTP混合液、0.01%ウシ血清アルブミンを含む緩衝液100 μ lに溶解し、5単位のT4 DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を加えて、37℃で15分間保温し平滑化反応を行った。

【0188】

該反応液より、Wizard DNA Clean-Up System(Promega社製)を用いて、平滑化されたDNA断片を回収した。

該DNA断片をベクターに挿入するために、下記条件でベクターの調製を行った。

【0189】

pBluescriptII SK(-)(STRATAGENE社製)の5 μ gを10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトールからなる緩衝液30 μ l中で15単位のEcoRV (宝酒造社製)により37℃で2時間消化反応を行った。

【0190】

該反応液よりエタノール沈殿により、pBluescriptII SK(-)消化DNA断片を回収した。

該DNA断片を50 mM トリス-塩酸 (pH 9.0)、1 mM 塩化マグネシウムからなる緩衝液30 μ l中で0.5単位のアルカリホスファターゼ(宝酒造社製; E.coli C75由来)を用い、60℃で30分間脱リン酸化反応を行った。

【0191】

得られた反応液をアガロース電気泳動にかけ、約3 kbのDNA断片を回収した。

該DNA断片を、QIAEX II gel extraction kit(QIAGEN社製)を用い、添付のマニュアルに従って精製した。

【0192】

上記で回収した平滑化されたDNA断片50 ngおよびpBluescriptII SK(-)のEcoRV、アルカリホスファターゼ処理済み断片50 ngを66 mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール、0.1 mM アデノシン3リン酸を含む緩衝液20 μ lに溶解し、T4 DNAリガーゼ (宝酒造社製) 175単位を加えて16℃で16時間結合反応を行った。

【0193】

該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、常法によりプラスミドpHENT1homologueを得た。

制限酵素解析の結果、プラスミドpHENT1homologueに含まれるDNA断片にはXbaI部位が1ヵ所存在し、挿入DNA断片中のXbaI部位とベクターpBluescriptII SK(-)のマルチクローニングサイト由来のXbaI部位からは約390 bpの断片が切り出されることが判明した。

【0194】

pHENT1homologueを30 μ g、10 mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム、50 mM 塩化ナトリウム、0.01% 牛血清アルブミン、1 mM ジチオスレイトールを含む緩衝液50 μ lに溶解し、40単位のXbaI (宝酒造社製)を加え、37℃で4時間消化反応を行った。

【0195】

該反応液をアガロース電気泳動にかけ、約390 bpのDNA断片を回収した。

該DNA断片を、QIAEX II gel extraction kit(QIAGEN社製)を用い、添付のマニュアルに従って精製した。

【0196】

精製された該DNA断片を、ECLダイレクト核酸ラベリング・検出システム (Amersham社製)を用いて、ホースラディッシュスーパーオキシダーゼ標識し、プローブとして用いた。

該プローブを用いてヒト胎児腎由来cDNAライブラリー (Clontech社製、商

品名：Human Fetal Kidney 5'-STRETCH PLUS cDNA Library) 5×10^5 クロ
ーンを用いて、ブランクハイブリダイゼーションを行い、プローブにハイブリダ
イズする6個の独立したファージクローン（ベクター： λ gt10）を得た（ク
ローン24-1、40-1、41A-1、41B-1、46-1および57-1
）。該ハイブリダイゼーションの操作は、全てECLダイレクト核酸ラベリング
・検出システム（Amersham社製）のマニュアルに従って行った。

【0197】

該ファージクローンのうちクローン46-1に含まれるcDNA断片を、ファ
ージベクターからプラスミドベクターへ組み換え直した。

該ファージクローン46-1のDNA $20 \mu\text{g}$ を、 10 mM トリス-塩酸（ $\text{pH} 7.5$ ）、 10 mM 塩化マグネシウム、 100 mM 塩化ナトリウム、 1 mM ジチオスレイトールを含む緩衝液 $30 \mu\text{l}$ 中に溶解し、 15 単位の EcoRI（宝酒造社製）を添加し、 37°C で4時間消化反応を行った。

【0198】

該反応液をアガロース電気泳動かけ、約 2.3 kb のDNA断片を回収した。
該DNA断片を、QIAEX II gel extraction kit（QIAGEN社製）を用い、添付の
マニュアルに従って精製した。

pBluescript II KS(-)（STRATAGENE社製） $5 \mu\text{g}$ を 10 mM トリス-塩酸（ $\text{pH} 7.5$ ）、 10 mM 塩化マグネシウム、 100 mM 塩化ナトリウム、 1 mM ジ
チオスレイトールを含む緩衝液 $30 \mu\text{l}$ に溶解し、 15 単位の EcoRI（宝酒
造社製）を添加し、 37°C で2時間消化反応を行った。

【0199】

該反応液よりエタノール沈殿により EcoRI 消化DNA断片を回収した。
該DNA断片を 50 mM トリス-塩酸（ $\text{pH} 9.0$ ）、 1 mM 塩化マグネシウ
ムを含む緩衝液 $30 \mu\text{l}$ に溶解し、 0.5 単位のアルカリホスファターゼ（E.
coli C75）（宝酒造社製）を添加し、 60°C で30分間脱リン酸化反応
を行った。

【0200】

該反応液をアガロース電気泳動にかけ、約 3 kb のDNA断片を回収した。

該DNA断片を、QIAEX II gel extraction kit(QIAGEN社製)を用い、添付のマニュアルに従って精製した。

上述のクローン46-1より得られた約2.3 kbのEcoRI DNA断片150 ngおよびpBluescriptII KS(-)のEcoRI-アルカリホスファターゼ処理済み断片50 ngを66 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール、0.1 mM アデノシン3リン酸を含む緩衝液20 μ lに溶解し、T4 DNAリガーゼ(宝酒造社製)175単位を添加し、16℃で16時間結合反応を行った。

【0201】

該結合反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、常法によりプラスミドp46-1を取得した。

該プラスミドに含まれるcDNA断片の塩基配列を決定することにより、プラスミドp46-1に、配列番号2に記載された約2.3 kbのcDNAが含まれ、該cDNAには1,425 bpのオープンリーディングフレーム(以下、ORFと略す)が存在することが分かった。

【0202】

p46-1の構造を図1に示す。

該ORFには、配列番号1に記載された475アミノ酸よりなる新規のポリペプチドがコードされていた。

該アミノ酸配列を、解析プログラム [Wisconsin Package (Genetics Computer Group, 米国)に含まれるBestfit] を用いて既知のヌクレオシドトランスポーターhENT1およびhENT2と比較したところ、約50%の相同性が認められた(図2)。

【0203】

また、種々のチャンネル、トランスポーターで基質特異性、輸送活性に膜貫通部位が重要であることが報告されており [FEBS Lett., 413, 142 (1997)、J. Biol. Chem., 269, 14865 (1994)、Biochemistry, 37, 1322 (1998)]、該ポリペプチドは既知のヌクレオシドトランスポーターの推定される膜貫通領域と高い相同性を有していた。

【0204】

以上の結果から、該ORFは新規ヌクレオシドトランスポーターをコードしていると考えられる。

p46-1にコードされる新規トランスポーターおよび既知のヌクレオシドトランスポーターhENT1およびhENT2のアミノ酸配列を基に疎水性プロットを比較した図を示す(図3)。

【0205】

実施例2 ノーザンハイブリダイゼーションによるmRNAの発現解析

実施例1で調製したプラスミドpHENT1homologueの15 μ gを10mM トリス-塩酸(pH7.5)、10mM 塩化マグネシウム、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトールからなる緩衝液50 μ lに溶解し、30単位のEcoRI(宝酒造社製)を加え、37℃で4時間消化反応を行った。

【0206】

該反応液を用い、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、DNA断片を回収した。

該DNA断片の1 μ gを、40mM トリス-塩酸(pH8.0)、6mM 塩化マグネシウム、2mM スペルミジン、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、1mM CTP、1mM GTP、0.65mM UTP、0.35mM デイゴキシゲニン-11-UTPを含む緩衝液50 μ lに溶解し、40単位のT7 RNAポリメラーゼ(ベーリンガー・マンハイム社製)を添加し、37℃で2時間in vitro転写反応を行った。

【0207】

反応後、得られた該反応液より、エタノール沈殿によりデイゴキシゲニン標識cRNAプローブを回収した。

該プローブを用いて、ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓のpoly(A)⁺ RNAフィルター[Human Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)]に対して、以下に示す条件に従いノーザンハイブリダイゼーションを行った。

【0208】

該フィルターを、50%ホルムアミド、5倍濃度のSSC（1倍濃度のSSCの組成は、150mM 塩化ナトリウムおよび15mM クエン酸ナトリウムよりなる）、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム（以下、SDSと略記する）、2% ブロッキング試薬（ベーリンガー・マンハイム社製）、0.1mg/ml サケ精子DNAを含む緩衝液（以下、ハイブリダイゼーションバッファーと略記する）中に浸漬し、70℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行った。

【0209】

該フィルターを、上述のディゴキシゲニン標識cRNAプローブが1 μ g/mlの濃度で溶解しているハイブリダイゼーションバッファーに浸漬し、70℃で15時間ハイブリダイゼーションを行った。

該フィルターを2倍濃度のSSC、0.1% SDSよりなる緩衝液中で70℃、10分間浸漬する条件で1回、0.2倍濃度のSSC、0.1% SDSよりなる緩衝液中で70℃、30分間浸漬する条件で3回洗浄した。

【0210】

該フィルターを100mM マレイン酸（pH7.5）、150mM 塩化ナトリウムよりなる緩衝液（以下、DIG I緩衝液と略記する）中で室温、15分間浸漬する条件で2回洗浄し、SDSを除去した。

該フィルターを100mM マレイン酸（pH7.5）、150mM 塩化ナトリウム、1% ブロッキング試薬よりなる緩衝液（以下、DIG II緩衝液と略記する）に浸漬し、1時間室温にてブロッキングを行った。

【0211】

該フィルターを、DIG II緩衝液で10000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ディゴキシゲニン抗体Fabフラグメント（ベーリンガー・マンハイム社製）溶液中に浸漬し、室温で30分間抗原抗体反応を行った。

該フィルターをDIG I緩衝液で室温、30分間浸漬する条件で3回洗浄し、余分な抗体を除去した後、100mM トリス-塩酸（pH9.0）、100mM 塩化ナトリウム、50mM 塩化マグネシウムからなる緩衝液（以下、DIG III緩衝液と略記する）に5分間浸漬し平衡化した。

【0212】

該フィルターを、DIG III緩衝液で100倍に希釈した発光基質CDP-S
tar（ベーリンガーマンハイム社製）溶液中に室温で15分間浸漬し、シグナ
ルを発光させ、オートラジオグラフィーで検出した。

結果を図4に示す。心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、全ての
臓器において約2.4キロヌクレオチドのバンドが認められた。胎盤、脾臓にお
いて特に強い発現が認められた。

【0213】

【発明の効果】

本発明により得られる新規トランスポーターポリペプチドのDNAを用いること
により、虚血性心疾患、腎炎、脾炎、高血圧等の疾患の診断、予防、治療が可能
となる。

【0214】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,

<120> A DNA CODING FOR NOVEL POLYPEPTIDE

<130> H10-1054N2

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 2 1 5 】

<210> 1

<211> 475

<212> PRT

<213> Human sapiens

<400> 1

Met Ala Val Val Ser Glu Asp Asp Phe Gln His Ser Ser Asn Ser Thr

1

5

10

15

Tyr Gly Thr Thr Ser Ser Ser Leu Arg Ala Asp Gln Glu Ala Leu Leu

20

25

30

Glu Lys Leu Leu Asp Arg Pro Pro Pro Gly Leu Gln Arg Pro Glu Asp

35

40

45

Arg Phe Cys Gly Thr Tyr Ile Ile Phe Phe Ser Leu Gly Ile Gly Ser

50

55

60

Leu Leu Pro Trp Asn Phe Phe Ile Thr Ala Lys Glu Tyr Trp Met Phe

65

70

75

80

Lys Leu Arg Asn Ser Ser Ser Pro Ala Thr Gly Glu Asp Pro Glu Gly

85

90

95

Ser Asp Ile Leu Asn Tyr Phe Glu Ser Tyr Leu Ala Val Ala Ser Thr

100

105

110

Val Pro Ser Met Leu Cys Leu Val Ala Asn Phe Leu Leu Val Asn Arg

115

120

125

Val Ala Val His Ile Arg Val Leu Ala Ser Leu Thr Val Ile Leu Ala

130

135

140

Ile Phe Met Val Ile Thr Ala Leu Val Lys Val Asp Thr Phe Ser Trp

145

150

155

160

Thr Arg Gly Phe Phe Ala Val Thr Ile Val Cys Met Val Ile Leu Ser

165

170

175

Gly Ala Ser Thr Val Phe Ser Ser Ser Ile Tyr Gly Met Thr Gly Ser

180

185

190

Phe Pro Met Arg Asn Ser Gln Ala Leu Ile Ser Gly Gly Ala Met Gly

195

200

205

Gly Thr Val Ser Ala Val Ala Ser Leu Val Asp Leu Ala Ala Ser Ser

210

215

220

Asp Val Arg Asn Ser Ala Leu Ala Phe Phe Leu Thr Ala Thr Ile Phe

225

230

235

240

Leu Val Leu Cys Met Gly Leu Tyr Leu Leu Leu Ser Arg Leu Glu Tyr

245

250

255

Ala Arg Tyr Tyr Met Arg Pro Val Leu Ala Ala His Val Phe Ser Gly

260

265

270

Glu Glu Glu Leu Pro Gln Asp Ser Leu Ser Ala Pro Ser Val Ala Ser

275

280

285

Arg Phe Ile Asp Ser His Thr Pro Pro Leu Arg Pro Ile Leu Lys Lys

290

295

300

Thr Ala Ser Leu Gly Phe Cys Val Thr Tyr Val Phe Phe Ile Thr Ser

305

310

315

320

Leu Ile Tyr Pro Ala Val Cys Thr Asn Ile Glu Ser Leu Asn Lys Gly

325

330

335

Ser Gly Ser Leu Trp Thr Thr Lys Phe Phe Ile Pro Leu Thr Thr Phe

340

345

350

Leu Leu Tyr Asn Phe Ala Asp Leu Cys Gly Arg Gln Leu Thr Ala Trp

355

360

365

Ile Gln Val Pro Gly Pro Asn Ser Lys Ala Leu Pro Gly Phe Val Leu

370

375

380

Leu Arg Thr Cys Leu Ile Pro Leu Phe Val Leu Cys Asn Tyr Gln Pro

385

390

395

400

Arg Val His Leu Lys Thr Val Val Phe Gln Ser Asp Val Tyr Pro Ala

405

410

415

Leu Leu Ser Ser Leu Leu Gly Leu Ser Asn Gly Tyr Leu Ser Thr Leu

420

425

430

Ala Leu Leu Tyr Gly Pro Lys Ile Val Pro Arg Glu Leu Ala Glu Ala

435

440

445

Thr Gly Val Val Met Ser Phe Tyr Val Cys Leu Gly Leu Thr Leu Gly

450

455

460

Ser Ala Cys Ser Thr Leu Leu Val His Leu Ile

465

470

475

【0216】

<210> 2

<211> 2240

<212> DNA

<213> Human sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (24)..(1451)

<400> 2

cggcggcgtg ggcgagcggc gac atg gcc gtt gtc tca gag gac gac ttt cag 53

Met Ala Val Val Ser Glu Asp Asp Phe Gln

1 5 10

cac agt tca aac tcc acc tac gga acc aca agc agc agt ctc cga gct 101

His Ser Ser Asn Ser Thr Tyr Gly Thr Thr Ser Ser Ser Leu Arg Ala

15 20 25

gac cag gag gca ctg ctt gag aag ctg ctg gac cgc ccg ccc cct ggc 149

Asp Gln Glu Ala Leu Leu Glu Lys Leu Leu Asp Arg Pro Pro Pro Gly

30 35 40

ctg cag agg ccc gag gac cgc ttc tgt ggc aca tac atc atc ttc ttc 197

Leu Gln Arg Pro Glu Asp Arg Phe Cys Gly Thr Tyr Ile Ile Phe Phe

45 50 55

agc ctg ggc att ggc agt cta ctg cca tgg aac ttc ttt atc act gcc 245

Ser Leu Gly Ile Gly Ser Leu Leu Pro Trp Asn Phe Phe Ile Thr Ala

60 65 70

aag gag tac tgg atg ttc aaa ctc cgc aac tcc tcc agc cca gcc acc 293

Lys Glu Tyr Trp Met Phe Lys Leu Arg Asn Ser Ser Ser Pro Ala Thr

75

80

85

90

ggg gag gac cct gag ggc tca gac atc ctg aac tac ttt gag agc tac 341

Gly Glu Asp Pro Glu Gly Ser Asp Ile Leu Asn Tyr Phe Glu Ser Tyr

95

100

105

ctt gcc gtt gcc tcc acc gtg ccc tcc atg ctg tgc ctg gtg gcc aac 389

Leu Ala Val Ala Ser Thr Val Pro Ser Met Leu Cys Leu Val Ala Asn

110

115

120

ttc ctg ctt gtc aac agg gtt gca gtc cac atc cgt gtc ctg gcc tca 437

Phe Leu Leu Val Asn Arg Val Ala Val His Ile Arg Val Leu Ala Ser

125

130

135

ctg acg gtc atc ctg gcc atc ttc atg gtg ata act gca ctg gtg aag 485

Leu Thr Val Ile Leu Ala Ile Phe Met Val Ile Thr Ala Leu Val Lys

140

145

150

gtg gac act ttc tcc tgg acc cgt ggc ttt ttt gcg gtc acc att gtc 533

Val Asp Thr Phe Ser Trp Thr Arg Gly Phe Phe Ala Val Thr Ile Val

155

160

165

170

tgc atg gtg atc ctc agc ggt gcc tcc act gtc ttc agc agc agc atc 581

Cys Met Val Ile Leu Ser Gly Ala Ser Thr Val Phe Ser Ser Ser Ile

175

180

185

tac ggc atg acc ggc tcc ttt cct atg agg aac tcc cag gca ctg ata 629
Tyr Gly Met Thr Gly Ser Phe Pro Met Arg Asn Ser Gln Ala Leu Ile
190 195 200

tca gga gga gcc atg ggc ggg acg gtc agc gcc gtg gcc tca ttg gtg 677
Ser Gly Gly Ala Met Gly Gly Thr Val Ser Ala Val Ala Ser Leu Val
205 210 215

gac ttg gct gca tcc agt gat gtg agg aac agc gcc ctg gcc ttc ttc 725
Asp Leu Ala Ala Ser Ser Asp Val Arg Asn Ser Ala Leu Ala Phe Phe
220 225 230

ctg acg gcc acc atc ttc ctc gtg ctc tgc atg gga ctc tac ctg ctg 773
Leu Thr Ala Thr Ile Phe Leu Val Leu Cys Met Gly Leu Tyr Leu Leu
235 240 245 250

ctg tcc agg ctg gag tat gcc agg tac tac atg agg cct gtt ctt gcg 821
Leu Ser Arg Leu Glu Tyr Ala Arg Tyr Tyr Met Arg Pro Val Leu Ala
255 260 265

gcc cat gtg ttt tct ggt gaa gag gag ctt ccc cag gac tcc ctc agt 869
Ala His Val Phe Ser Gly Glu Glu Glu Leu Pro Gln Asp Ser Leu Ser
270 275 280

gcc cct tcg gtg gcc tcc aga ttc att gat tcc cac aca ccc cct ctc 917
Ala Pro Ser Val Ala Ser Arg Phe Ile Asp Ser His Thr Pro Pro Leu
285 290 295

cgc ccc atc ctg aag aag acg gcc agc ctg ggc ttc tgt gtc acc tac 965

Arg Pro Ile Leu Lys Lys Thr Ala Ser Leu Gly Phe Cys Val Thr Tyr	
300	305 310
gtc ttc ttc atc acc agc ctc atc tac ccc gcc gtc tgc acc aac atc	1013
Val Phe Phe Ile Thr Ser Leu Ile Tyr Pro Ala Val Cys Thr Asn Ile	
315	320 325 330
gag tcc ctc aac aag ggc tgc ggc tca ctg tgg acc acc aag ttt ttc	1061
Glu Ser Leu Asn Lys Gly Ser Gly Ser Leu Trp Thr Thr Lys Phe Phe	
335	340 345
atc ccc ctc act acc ttc ctc ctg tac aac ttt gct gac cta tgt ggc	1109
Ile Pro Leu Thr Thr Phe Leu Leu Tyr Asn Phe Ala Asp Leu Cys Gly	
350	355 360
cgg cag ctc acc gcc tgg atc cag gtg cca ggg ccc aat agc aag gcg	1157
Arg Gln Leu Thr Ala Trp Ile Gln Val Pro Gly Pro Asn Ser Lys Ala	
365	370 375
ctc cca ggg ttc gtg ctc ctc cgg acc tgc ctc atc ccc ctc ttc gtg	1205
Leu Pro Gly Phe Val Leu Leu Arg Thr Cys Leu Ile Pro Leu Phe Val	
380	385 390
ctc tgt aac tac cag ccc cgc gtc cac ctg aag act gtg gtc ttc cag	1253
Leu Cys Asn Tyr Gln Pro Arg Val His Leu Lys Thr Val Val Phe Gln	
395	400 405 410
tcc gat gtg tac ccc gca ctc ctc agc tcc ctg ctg ggg ctc agc aac	1301
Ser Asp Val Tyr Pro Ala Leu Leu Ser Ser Leu Leu Gly Leu Ser Asn	

415

420

425

ggc tac ctc agc acc ctg gcc ctc ctc tac ggg cct aag att gtg ccc 1349

Gly Tyr Leu Ser Thr Leu Ala Leu Leu Tyr Gly Pro Lys Ile Val Pro

430

435

440

agg gag ctg gct gag gcc acg gga gtg gtg atg tcc ttt tat gtg tgc 1397

Arg Glu Leu Ala Glu Ala Thr Gly Val Val Met Ser Phe Tyr Val Cys

445

450

455

ttg ggc tta aca ctg ggc tca gcc tgc tct acc ctc ctg gtg cac ctc 1445

Leu Gly Leu Thr Leu Gly Ser Ala Cys Ser Thr Leu Leu Val His Leu

460

465

470

atc tag aaggaggac acaaggacat tgggtgcttca gagcctttga agatgagaag 1501

Ile

475

agagtgcagg agggctgggg gccatggagg aaaggcctaa agtttcactt ggggacagag 1561

agcagagcac actcgggcct catccctccc aagatgccag tgagccacgt ccatgccccat 1621

tccgtgcaag gcagatatc cagtcattt aacagaacac tcctgagaca gttgaagaag 1681

aaatagcaca aatcaggggt actcccttca cagctgatgg ttaacattcc accttctttc 1741

tagcccttca aagatgctgc cagtgttcgc cctagagtta ttacaaagcc agtgccaaaa 1801

cccagccatg ggctctttgc aacctcccag ctgcgctcat tccagctgac agcgagatgc 1861

aagcaaatgc tcagctctcc ttaccctgaa ggggtctccc tggaatggaa gtcccctggc 1921

atggtcagtc ctcaggccca agactcaagt gtgcacagac ccctgtgttc tgtgggtgaa 1981

caactgcccc ctaaccagac tggaaaaccc agaaagatgg gccttccatg aatgcttcat 2041

tccagaggga ccagagggcc tccctgtgca agggatcaag catgtctggc ctgggttttc 2101

aaaaaaagag ggatcctcat gacctgggtg tctatggcct gggatcaagat gagggctttt 2161

cagtgttctt gtttacaaca tgtcaaagcc attggttcaa gggcgtaata aatacttgcg 2221

tattcaaaaa aaaaaaaaaa

2240

【0217】

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

actttgctga cctacgtggc

20

【0218】

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

tacgcccttg aaccaatggc

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 プラスミド p46-1 の構築過程および制限酵素地図を示した図である。

【図2】 p46-1 にコードされる新規ヒトトランスポーター(hENTR1)のアミノ酸配列とヒト e s 型トランスポーター hENT1 およびヒト e i 型トランスポーター hENT2 のアミノ酸配列を比較した図である。アステリスクで示した箇所は一致しているアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)

【図3】 p46-1 にコードされる新規ヒトトランスポーター(hENTR1)、ヒト e s 型トランスポーター hENT1 およびヒト e i 型トランスポーター hENT2 のアミノ酸配列を基に疎水性プロットを比較した図である。

【図4】 新規ヒトトランスポーター(hENTR1) cDNA の一部の配列 (約 1 kb) をプローブとしてヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓の poly(A)⁺ RNA フィルター [Human Multiple Tissue Northern Blots のフィルター (Clontech 社製)] に対してノーザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す。

【符号の説明】

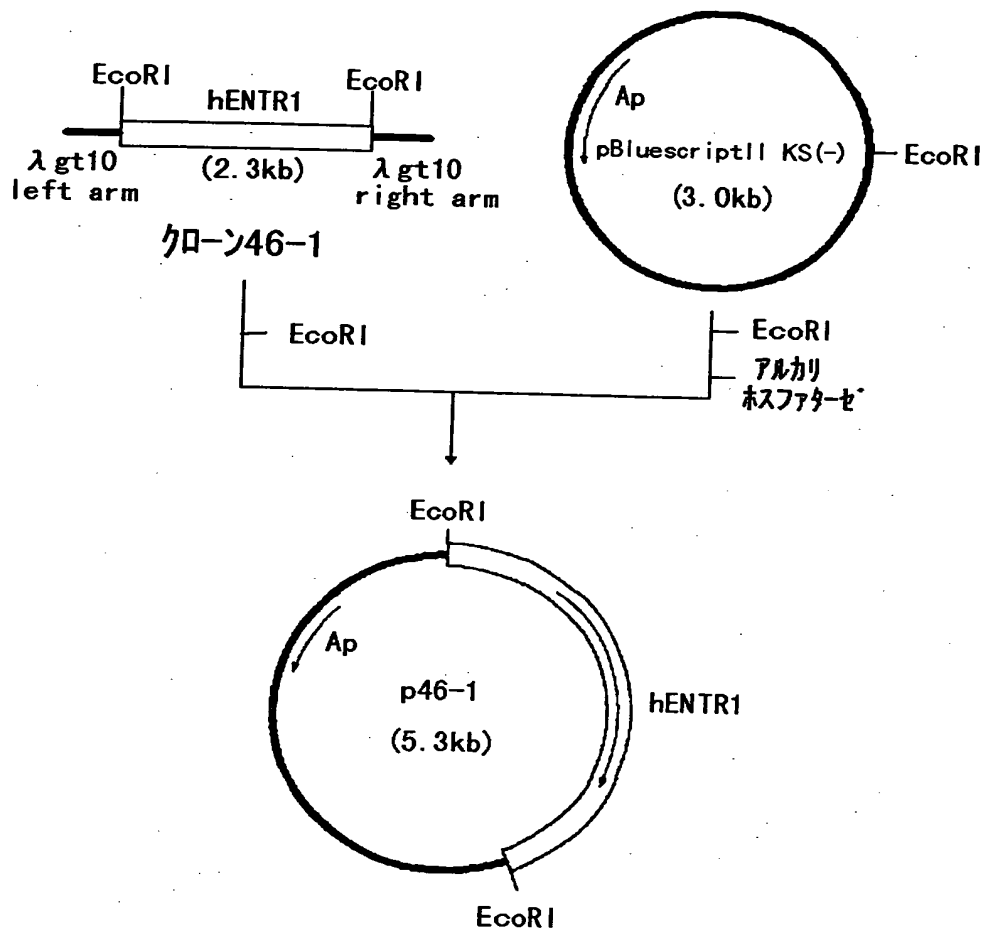
kb: キロ塩基対 (kilobase pairs)

Ap: アンピシリン耐性遺伝子

knt: キロヌクレオチド (kilonucleotides)

【書類名】 図面

【図 1】

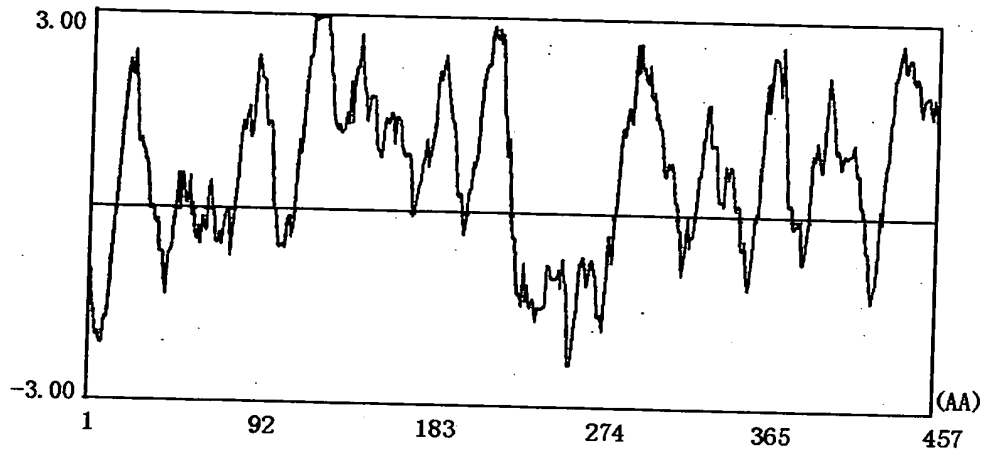


【图 2】

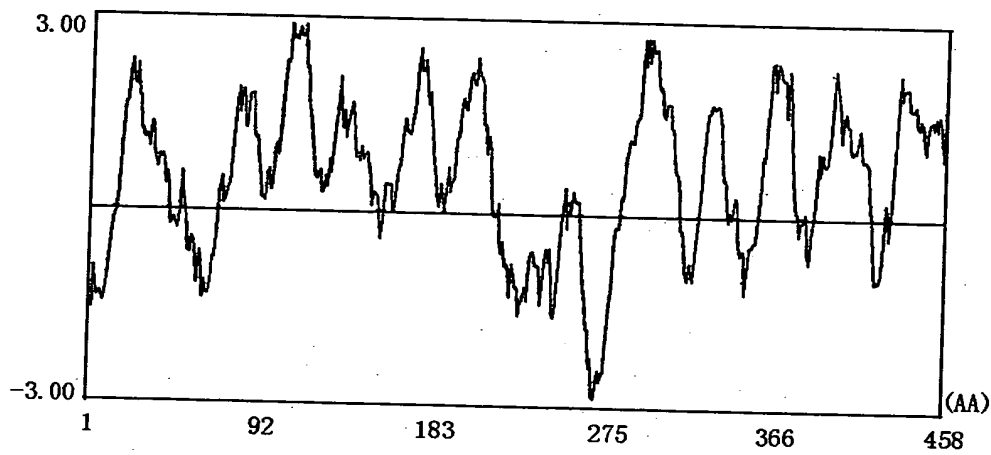
hENT1	1:_____	MITSHQPDQRYKAVWLIFFML	21
hENT2	1:_____	MARGADPRDSYHLVGISFFIL	21
hENTR1	1:MAVVSDDPQHSSNSTYGTSSSLRADQEALLEKLLDRPPGLQRPEDRFCGYTIIFFSL	** ** *	60
hENT1	22:GLGTLLPNWFFMTATQYFTNRLDMSQNSVLTAELS KDAQASAPAAPLPERNSLSAI-F		80
hENT2	22:GLGTLLPNWFFITAIPYFQARLA_____	GAGNSTARILSTNHTGPEDAFNF	67
hENTR1	61:GTGSLLPWNFFITAKEYWMFKL_____	RNSSSPATGEDPEGSDILNYF	103
	* * * * * *	* * *	
hENT1	81:NNVMILCAMLPLLLFTYLSNFLHQRI PQSVRI LGSVAILLVFLITAILVKVQL- DALP		138
hENT2	68:NNWVTLLSQLPLLLFTLLNSFLYQCV PETVRILGSLA ILLLFALTAALVKVDM- SPGP		125
hENTR1	104:ESYLAVASTVPSMLCLVANFLVN RVAVHIRVLA SLTVILAIFM VITALVKVDITFSWIRG		163
	* * * * *	* * * * *	
hENT1	139:FFVTIMIKIVLINSFGAILQGSFLGLAGLLPASYTAPIMSGQGLAGFFASVAMICAIASG		198
hENT2	126:FFSITMASVCFINSFSAVLQCSLFGQLTMPSTYSTILFLSGQGLAGIFAALAMLLSMASG		185
hENTR1	164:FFAVTIVCMVILSGASTVFSSSYGMITGSPFMRNSQALISGGAMGGTVSAVASLVDLAAS		223
	** *	* * * * *	
hENT1	199:SELSESAGFYFITACAVIILTIICYLGLPRLEFYRYYYQLK-LEGPEQETKLDLISKG		256
hENT2	186:VDAETSALGYFITPCVGLIMSTIVCYLSLPHLKFARYYLANKSSQAAQAELETKAELLQSD		245
hENTR1	224:SDVRNSALAFFLTATIFLVLCMGLYLLSRLEYARYYMR-_____	PVLAHVFSGE	273
	** *	* * * * *	
hENT1	257:EEPRAGK_____	EESGVSVSNSQPTINESHSIKAILKNISVLAFSVCFIFTITI	304
hENT2	246:ENGIPSSPQKVALTLDLDLEKEPESEPDEPQKPGKPSVFTVFOKIWL TALCLVLVFTVTL		305
hENTR1	274:EELPQDSL-_____	SAPSVASRFIDSHTPLRPIKKTASLGFCVTYVFFITS	320
	*	*	
hENT1	305:GMFFAVTVEVKSSIAGSSTW-ERYFIPVSCFLT FNIFD WLGRLTAVFMWPGKDSRWLP		362
hENT2	306:SVFPATITAMVTSS-TSPGKW-SQFFNPICCFLLFNIMDWLGRLTSYFLWPDEDSRLLP		362
hENTR1	321:LIYPAVCINIESLNKSGSLWTTKFFIPLTTFLLYNFADLCGRQLTAWIQVPGPNKALP		380
	** *	* * * * *	
hENT1	363:SLVLARLVFVPLLLCNIKPRRYL-TVFEHDAWFIFFMAAFASNGYLASLCMCFGPKK		421
hENT2	363:LLVCLRFLFVPLFMLCHVPQRSRL-PILFPQDAYFITFMLLFAVSNGYLVSLTMCLAPRQ		421
hENTR1	381:GFVLLRTCLIPFLVLCNYQPRVHLKTVVFQSDVYPALLSSLLGLSNGYLSLALLYGPKI		440
	* * * * *	* * * * *	
hENT1	422:VKPAEAEATAGAIMAFFLCLGLALGAVFSFLFRAIV	456	
hENT2	422:VLPHEREVAGALMTFFLALGLSCGASLSFLFKALL	456	
hENTR1	441:VPRELAEATGVVMSFYVCLGLTLGSACSTLLVHLI	475	
	* * * * *	* * * * *	

【図3】

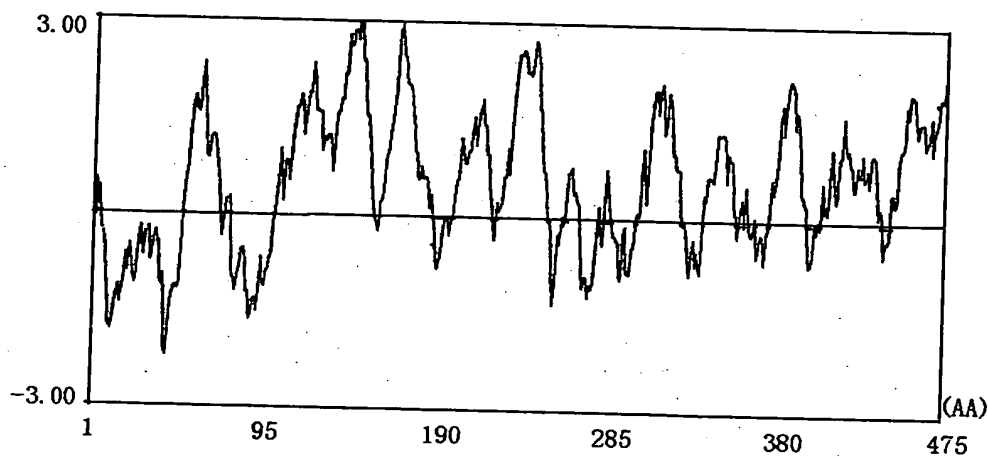
hENT1



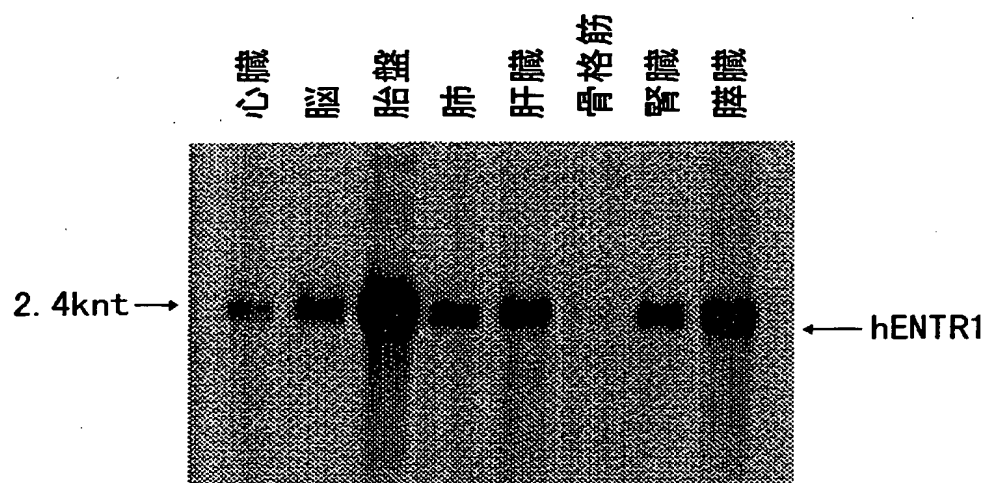
hENT2



hENTR1



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヌクレオシド等の分子を細胞内に輸送または細胞外に排出する新規トランスポーターポリペプチド、該トランスポーターポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドを認識する抗体を利用し、虚血性心疾患、脳卒中時の脳障害、臓器移植に伴う免疫反応、悪性腫瘍、腎炎、膵炎または高血圧等の予防薬、治療薬を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、ヌクレオシドのトランスポート活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAの製造法、該DNAを組み込んで得られる組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法および該DNAあるいは該抗体を用いた脳疾患、腎疾患または癌等の疾患の診断法を提供することができる。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000001029

【住所又は居所】

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

【氏名又は名称】

協和醗酵工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名 協和醗酵工業株式会社

**PThis Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)